

PCT

ORGANISATION MONDIALE  
BREVETS

WO 9603505A1

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU I

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :C12N 15/29, 1/21, 1/19, C12Q 1/68,  
A01H 5/00

A1

(43) Date de publication internationale: 8 février 1996 (08.02.96)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01005

(22) Date de dépôt international: 26 juillet 1995 (26.07.95)

(30) Données relatives à la priorité:

94/09235 26 juillet 1994 (26.07.94)

FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT  
NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE  
[FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75341 Paris Cédex 07  
(FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): GAUTHIER, Marie-  
Françoise [FR/FR]; 16, rue Cyrano-de-Bergerac, F-34090  
Montpellier (FR). LULLIEN-PELLERIN, Valérie [FR/FR];  
79, rue René-Clair, Les Collines d'Estanove, F-34070  
Montpellier (FR). DE LAMOTTE, Frédéric [FR/FR]; Les  
Portes d'Estanove, Bâtiment D, 2500, boulevard Paul-  
Valéry, F-34070 Montpellier (FR). JOUDRIER, Philippe  
[FR/FR]; 60, rue Jeanne-Garnerin, F-34070 Montpellier  
(FR).(74) Mandataire: PHELIP, Bruno; Cabinet Harlé & Phélip, 21, rue  
de La Rochefoucauld, F-75009 Paris (FR).(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE,  
FI, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT,  
LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD,  
SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet  
européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO  
(KE, MW, SD, SZ, UG).

Publiée

*Avec rapport de recherche internationale.**Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si de telles modifications sont  
reçues.*(54) Title: HARD AND SOFT WHEAT THIOREDOXINS h, HOMOLOGOUS PROTEINS, DNA FRAGMENTS CODING FOR SAID  
PROTEINS AND METHODS FOR PREPARING SAME(54) Titre: THIOREDOXINES h DE BLE TENDRE ET DE BLE DUR ET PROTEINES PRESENTANT DES SIMILITUDES  
FRAGMENTS D'ADN CODANT POUR CES PROTEINES ET PROCEDES D'OBTENTION

Gly Glu Val Ile Ser Val His Ser Leu Glu Gln Trp Thr  
Met Gln Ile Glu Glu Ala Asn Ala Ala Lys Lys Leu Val  
Val Ile Asp Phe Thr Ala Ser Trp Cys Gly Pro Cys Arg  
Ile Met Ala Pro Ile Phe Ala Asp Leu Ala Lys Lys Phe  
Pro Ala Ala Val Phe Leu Lys Val Asp Val Asp Glu Leu  
Lys Pro Ile Ala Glu Gln Phe Ser Val Glu Ala Met Pro  
Thr Phe Leu Phe Met Lys Glu Gly Asp Val Lys Asp Arg  
Val Val Gly Ala Ile Lys Glu Glu Leu Thr Thr Lys Val  
Gly Leu His Ala Ala

(I)

(57) Abstract

A protein having at least 65 % sequence homology with the sequence (I). This protein may particularly be hard wheat or soft wheat thiorédoxin h. The DNA corresponding to said protein may be integrated into an expression vector for production by microorganisms.

(57) Abrégé

Protéine présentant une similitude de séquence d'au moins 65 % avec la séquence (I). Cette protéine peut être en particulier la thiorédoxine h de blé dur ou de blé tendre. L'ADN correspondant à cette protéine peut être intégré dans un vecteur d'expression en vue de sa production par des micro-organismes.

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

**Thiorédoxines h de blé tendre et de blé  
dur et protéines présentant des similitudes,  
5 fragments d'ADN codant pour ces protéines  
et procédés d'obtention**

La présente invention a pour objet des  
thiorédoxines h de blé tendre et de blé dur, des  
10 protéines présentant des similitudes ainsi que des  
fragments d'ADN codant pour ces protéines.

Elle est en outre relative à des procédés  
d'obtention de ces protéines.

Les thiorédoxines sont des protéines de petites  
15 tailles impliquées dans divers processus biologiques  
et vraisemblablement présentes dans tous les  
organismes vivants.

Elles interviennent entre autres comme donneurs  
d'hydrogène pour des réductases (ribonucléotide,  
20 méthionine sulfoxyde et sulfate réductase) et comme  
oxydoréductases des fonctions disulfure de plusieurs  
protéines. Pour les propriétés générales des  
thiorédoxines on pourra avantageusement se référer à  
la revue de Pille (Annales de l'Institut Pasteur,  
25 volume 1, 34-50, 1992) ou de Holmgren (TIBS, Janvier  
1981, 26-29).

Si les thiorédoxines de bactéries sont bien  
connues, les thiorédoxines h des organismes  
supérieurs, et en particulier des plantes ont été  
30 assez peu étudiées.

Ainsi, seules les thiorédoxines h de tabac  
(Marty et Meyer, Plant Molecular Biology, 17, 143-147,  
1991; Brugidou et al., Mol Gen Genet, 238, 285-293,  
1993), de riz (séquence EMBL N° D 26547),  
35 d'Arabidopsis thaliana (Rivera-Madrid et al., Plant

Physiol, 102, 327-328, 1993) et de *Chlamydomonas reinhardtii* (Decottignies et al. Eur. J. Biochem, 198, 505-512, 1991) ont été à ce jour séquencées.

Leur séquençage a été effectué à partir d'ADN  
5 complémentaire sélectionné dans des banques d'ADN de  
tabac ou d'*Arabidopsis thaliana* par hybridation du  
clone portant l'ADN complémentaire codant pour la  
thiorédoxine h avec une sonde correspondant à un ADN  
complémentaire de la thiorédoxine h1 de tabac pour  
10 *Arabidopsis thaliana* (Rivera-Madrid et al.  
précédemment cité), c'est-à-dire une sonde  
hétérologue, ou après criblage par hybridation  
différentielle (Marty et Meyer, précédemment cités).

Zhong-Ru Gan (J. Biol. Chem, 1991, 266 (3),  
15 1692-1696) a séquencé une thiorédoxine de levure. Des  
amorces correspondant à des séquences encadrant le  
site actif de cette thiorédoxine ont été utilisées  
pour amplifier un fragment de 34 paires de base. Ce  
fragment a alors été utilisé comme sonde dans une  
20 hybridation du type Southern pour le criblage d'une  
banque génomique de levure.

Muller et Buchanan (J. Biol. Chem. 1989, 264  
(7), 4008-4014) ont quant à eux décrits le clonage  
d'un gène codant pour une thiorédoxine m, et non une  
25 thiorédoxine h. La stratégie utilisée pour le clonage  
consiste à faire une hybridation du type Southern du  
génom de la bactérie *Anacystis nidulans*, avec une  
sonde présentant des similitudes avec les sites actifs  
d'autres thiorédoxines m puis à cloner le fragment  
30 correspondant.

A la connaissance du demandeur, les seules  
séquences de thiorédoxine h de plantes qui étaient

publiées, et pouvaient donc être utilisées comme sondes, étaient celles de tabac et de *Chlamydomonas reinhardtii*; c'est-à-dire d'une plante dicotylédone et d'une algue unicellulaire.

5            Ces sondes s'hybrident de manière hétérologue avec des ADN complémentaires d'autres plantes présentant une grande distance évolutive, les monocotylédones.

10           Ainsi, l'homme du métier désireux de sélectionner des clones d'ADN complémentaires dans des banques de plantes mono-cotylédones était incité à utiliser des sondes hétérologues, donc peu spécifiques, et ce d'autant plus qu'excepté le site actif, il existe peu de similarité entre les séquences  
15           de thiorédoxines h, et induisant ainsi des risques d'erreurs dans la sélection des clones empêchant toute sélection spécifique.

          Or, les thiorédoxines h interviennent de manière importante chez le blé lors de la germination,  
20           et aussi en réduisant de manière spécifique les gluténines et d'autres protéines du grain de blé (Kobrehel et al, 1992, Plant Physiol., 99, 919-924). Afin d'améliorer la qualité de la farine de blé, par exemple l'état d'oxydo-réduction de certaines  
25           protéines contenues dans cette farine, on peut modifier l'activité des thiorédoxines h, au niveau génétique, en modifiant les gènes des thiorédoxines h ou en ajoutant de nouvelles copies de ces gènes ou d'ADN complémentaires correspondant à ces gènes.

30           Il peut être aussi envisagé de rajouter des thiorédoxines produites par des microorganismes dans des produits à usage alimentaire, ou de les utiliser pour supprimer l'effet antinutritionnel des

légumineuses ou pour inactiver des toxines, par exemple de venin d'abeilles ou de serpents. Dans tous ces cas, il peut être nécessaire, voire indispensable, d'utiliser des ADN complémentaires correspondant au gène de thiorédoxine h pour produire ces protéines.

L'homme du métier se trouvait donc confronté à une absence de méthode fiable permettant la sélection dans une banque d'ADN complémentaire, de clones codant pour les thiorédoxines h.

Le demandeur s'est donc attaché à rechercher une sonde permettant de sélectionner de manière spécifique et fiable des clones de thiorédoxine h dans une banque d'ADN complémentaire.

Il a montré qu'il était possible d'effectuer une telle sélection en utilisant une sonde codant pour une séquence d'acides aminés composant le site actif des thiorédoxines.

Il a en outre montré que les thiorédoxines h de blés dur et tendre présentent d'une part une grande similitude entre elles, mais d'autre part des grandes différences de structure primaire par rapport aux autres thiorédoxines h de plantes dont les séquences sont déjà connues.

La présente invention a pour objet des protéines présentant une similitude de séquence d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N° 1 suivante:

Gly Glu Val Ile Ser Val His Ser Leu Glu Gln Trp Thr  
Met Gln Ile Glu Glu Ala Asn Ala Ala Lys Lys Leu Val  
Val Ile Asp Phe Thr Ala Ser Trp Cys Gly Pro Cys Arg  
Ile Met Ala Pro Ile Phe Ala Asp Leu Ala Lys Lys Phe  
Pro Ala Ala Val Phe Leu Lys Val Asp Val Asp Glu Leu  
Lys Pro Ile Ala Glu Gln Phe Ser Val Glu Ala Met Pro  
Thr Phe Leu Phe Met Lys Glu Gly Asp Val Lys Asp Arg

Val Val Gly Ala Ile Lys Glu Glu Leu Thr Thr Lys Val  
Gly Leu His Ala Ala

Préférentiellement, de telles protéines  
présentent une similitude avec la séquence SEQ ID N°1  
5 d'au moins 75% et encore plus préférentiellement d'au  
moins 85 %.

La présente invention a ainsi pour objet la  
thiorédoxine h de blé tendre présentant la séquence  
SEQ ID N°3 suivante:

10

Met Ala Ala Ser Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala  
Ala Val Gly Ala Gly Glu Val Ile Ser Val His Ser Leu  
Glu Gln Trp Thr Met Gln Ile Glu Glu Ala Asn Ala Ala  
15 Lys Lys Leu Val Val Ile Asp Phe Thr Ala Ser Trp Cys  
Gly Pro Cys Arg Ile Met Ala Pro Ile Phe Ala Asp Leu  
Ala Lys Lys Phe Pro Ala Ala Val Phe Leu Lys Val Asp  
Val Asp Glu Leu Lys Pro Ile Ala Glu Gln Phe Ser Val  
Glu Ala Met Pro Thr Phe Leu Phe Met Lys Glu Gly Asp  
20 Val Lys Asp Arg Val Val Gly Ala Ile Lys Glu Glu Leu  
Thr Thr Lys Val Gly Leu His Ala Ala Gln

Elle est en outre relative à la thiorédoxine h  
de blé dur présentant la séquence SEQ ID N°5 suivante:

Met Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Thr Thr Ala Ala Ala  
25 Thr Ala Ala Ala Val Gly Pro Gly Glu Val Ile Ser Val  
His Ser Leu Glu Gln Trp Thr Met Gln Ile Glu Glu Ala  
Asn Ala Ala Lys Lys Leu Val Val Ile Asp Phe Thr Ala  
Ser Trp Cys Gly Pro Cys Arg Ile Met Ala Pro Ile Phe  
Ala Asp Leu Ala Lys Lys Phe Pro Ala Ala Val Phe Leu  
30 Lys Val Asp Val Asp Glu Leu Lys Pro Ile Ala Glu Gln  
Phe Ser Val Glu Ala Met Pro Thr Phe Leu Phe Met Lys  
Glu Gly Asp Val Lys Asp Arg Val Val Gly Ala Ile Lys  
Glu Glu Leu Thr Thr Lys Val Gly Leu His Ala Ala Ala

Des peptides comprenant au moins un fragment

d'une de ces protéines font aussi partie de la présente invention.

La présente invention a en outre pour objet des fragments d'ADN codant pour une de ces protéines ou un  
5 de ces peptides et en particulier un fragment codant pour la thiorédoxine h de blé tendre comprenant la séquence SEQ ID N°2 suivante:

```
ATGGCGGCGT CGGCGGCGAC GGCGACGGCG ACGGCGGCGG CGGTAGGGGC
GGGGGAGGTG ATCTCCGTCC ACAGCCTGGA GCAGTGGACC ATGCAGATCG
10 AGGAGGCCAA CGCCGCCAAG AAGCTGGTGG TGATTGACTT CACTGCATCA
TGGTGC GGAC CATGCCGCAT TATGGCTCCA ATTTTCGCTG ATCTCGCCAA
GAAGTTCCCA GCTGCTGTTT TCCTCAAGGT CGACGTTGAT GAACTGAAGC
CCATTGCTGA GCAATTCAGC GTGGAGGCCA TGCCAACCTT CCTGTTCATG
AAGGAAGGAG ATGTCAAGGA CAGGGTTGTC GGAGCTATCA AGGAGGAACT
15 GACGACCAAG GTTGGGCTAC ACGCGGCCCA GTAA
```

et un fragment codant pour la thiorédoxine de blé dur comprenant la séquence SEQ ID N°4 suivante :

```
ATGGCGGCGG CGGCGACGGC GACGACTACA GCGGCGGCGA CGGCGGCGGC
GGTGGGGCCG GGGGAGGTGA TCTCCGTCCA CAGCCTGGAG CAGTGGACCA
20 TGCAGATCGA GGAGGCCAAC GCCGCCAAGA AGCTGGTGGT GATTGACTTC
ACTGCATCAT GGTGCGGACC ATGCCGCATC ATGGCTCCAA TTTTGTCTGA
TCTCGCCAAG AAGTTCCCAG CTGCTGTTTT CCTCAAGGTC GACGTTGATG
AACTGAAGCC CATTGCTGAG CAATTCAGCG TCGAGGCCAT GCCAACCTTC
CTGTTCATGA AGGAAGGAGA CGTCAAGGAC AGGGTTGTCG GAGCTATCAA
25 GGAGGAGCTG ACGACCAAGG TTGGGCTCCA CGCGGCTGCC TAG
```

Elle a aussi pour objet une méthode de sélection dans une banque d'ADN complémentaire de clones codant pour une thiorédoxine h caractérisée en ce qu'on hybride lesdits clones avec une sonde  
30 présentant une similitude de séquences proche de 100% avec le site actif des thiorédoxines.

Avantageusement, une telle sonde présente la séquence suivante : (SEQ ID N° 6)



TGGTGX<sub>1</sub>GGX<sub>2</sub>CCX<sub>3</sub>TGX<sub>4</sub>AAX<sub>5</sub>ATG

dans laquelle :

X<sub>1</sub> représente C ou T

X<sub>2</sub> représente T ou A

5 X<sub>3</sub> représente A, G, C ou T

X<sub>4</sub> représente C ou T

X<sub>5</sub> représente G ou A

On remarquera, comme le montrent les comparaisons effectuées dans les exemples qui suivent  
10 , que les thiorédoxines h de blé présentent une grande différence de structure primaire par rapport aux thiorédoxines h de plantes déjà connues.

Il n'était donc en rien évident pour l'homme du métier de déduire les séquences de ces thiorédoxines h  
15 de blé des séquences d'autres thiorédoxines h divulguées dans l'état de la technique.

En outre, l'obtention d'ADN complémentaires (ADNc) pour un gène donné n'est pas, malgré les développements récents dans les techniques de biologie  
20 moléculaire, une technique de routine.

En effet, l'obtention d'un ADNc particulier nécessite la mise au point d'un procédé spécifique qui va bien au-delà d'une simple adaptation d'une technique. En particulier le choix du matériel dont  
25 sont extraits les ARN messagers est essentiel. Cette spécificité est d'autant renforcée que les ARN messagers sont en faibles quantités ce qui est le cas de la présente invention.

On notera de plus que l'utilisation  
30 d'oligonucléotides dégénérés pour cribler les ADN complémentaires n'avait jamais été mise en oeuvre dans le cas des thiorédoxines h . Il n'était en rien évident qu'une telle utilisation permette un criblage

efficace.

Le blé est une graminée d'un poids économique considérable et son amélioration, ainsi que celle de ses produits en utilisant les thiorédoxines h ou des fragments d'ADN codant pour ces protéines, constituent des progrès techniques importants.

La présente invention est de plus relative à des vecteurs d'expression portant un fragment d'ADN tel que défini ci-dessus, et en particulier portant au moins une partie de la séquence SEQ ID N°2 ou de la séquence SEQ ID N°4 décrites ci-dessus.

De tels vecteurs comprennent au moins :

- une origine de répllication adaptée à l'espèce biologique, microorganisme ou autre, dans laquelle on souhaite reproduire le vecteur;

- un promoteur situé en amont du fragment d'ADN, adapté à l'espèce biologique dans laquelle on souhaite exprimer les protéines selon l'invention.

Ils peuvent aussi comprendre des séquences de régulation de l'expression du promoteur. Ce promoteur peut être soumis à régulation selon les conditions de culture des microorganismes.

De tels vecteurs peuvent être particulièrement des vecteurs de sécrétion, ou d'excrétion.

De manière avantageuse, les fragments d'ADN définis ci-dessus sont intégrés dans un plasmide, et en particulier dans le plasmide pET commercialisé par Novagen (USA).

Des vecteurs pETtrxTa et pFL6ltrxTa portant la séquence identifiée ci-dessus SEQ ID N°2 ont été déposés respectivement sous les numéros I-1442 et I-1443 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur (CNCM).

D'autres objets de la présente invention sont des microorganismes, des cellules eucaryotes, et en particulier des cellules végétales ou animales, et des plantes transgéniques portant une des séquences  
5 définies ci-dessus. Un tel microorganisme est avantageusement une bactérie, telle que E. coli ou une corynébactérie, une levure ou un champignon filamenteux. Des cellules animales peuvent être, par exemple, des cellules d'insectes.

10 Les espèces biologiques portant ces fragments et/ou vecteurs sont choisies afin de permettre une expression des protéines selon l'invention.

Enfin, la présente invention est relative à un procédé de production des protéines selon l'invention,  
15 et en particulier de thiorédoxines h, comprenant les étapes suivantes :

- culture d'un microorganisme tel que défini ci-dessus, et

- isolement des protéines ou peptides selon  
20 l'invention produits par ledit microorganisme.

Le présent procédé n'est pas limité à l'obtention de dérivés de thiorédoxines h de blé. Il peut aussi être appliqué à la production de thiorédoxines h d'autres céréales telles que le maïs,  
25 l'orge, le seigle, le sorgho ou le riz, de légumineuses telles que le soja, l'haricot ou le pois ou d'oléagineux tels que le tournesol, le chanvre, le lin ou le colza, ou de dérivés de ces thiorédoxines h, à l'aide de vecteurs portant des séquences codant pour  
30 ces protéines.

Avantageusement, les microorganismes sont lysés après culture et les protéines selon l'invention sont récupérées par des méthodes connues de l'homme du

métier.

L'homme du métier pourra se référer, si nécessaire, pour la préparation des protéines selon l'invention, de leurs vecteurs ou de microorganismes portant ces vecteurs, et de manière générale pour la mise en oeuvre de la présente invention au manuel suivant : Maniatis et al. Molecular cloning : A Laboratory Manual , Cold Spring Harbor Laboratory 1982 ou à une de ses récentes rééditions.

Les protéines objets de la présente invention ou pouvant être obtenues selon un procédé objet de la présente invention peuvent être utilisées dans de nombreuses applications, en particulier, comme additifs dans des produits à usage alimentaire ou non alimentaire, pour la suppression de l'effet antinutritionnel des légumineuses, pour l'inactivation de diverses toxines en particulier celles de venin d'abeilles et de serpents.

Ces applications et d'autres applications sont répertoriées dans la demande PCT/US 92/08 595 dont le contenu est intégré à la présente demande par référence.

La production de thiorédoxine h de blé dans la levure, en particulier *Saccharomyces cerevisiae*, permet de l'utiliser directement dans les produits alimentaires sous forme de levures enrichies en thiorédoxine h (par induction de l'expression du gène ou par accumulation de la thiorédoxine h dans la levure), sous forme lyophilisée par exemple.

Le fait d'obtenir des thiorédoxines h de blé par le procédé selon l'invention permet de les ajouter à un produit consommé par les humains tout en leur conservant leur caractère naturel.

La présente invention permet en outre d'obtenir de la thiorédoxine h de blé en quantité importante (par rapport à une purification à partir de blé) par exemple à partir de cultures de bactéries ou de levures et d'ajouter cette thiorédoxine h, après purification ou en utilisant des levures enrichies (surexprimant la thiorédoxine h), à des produits céréaliers en vue d'améliorer leur valeur d'utilisation.

Le fait de disposer des séquences codant pour les thiorédoxines h de blés dur ou tendre permet de les modifier par mutagenèse dirigée et d'obtenir des thiorédoxines h dont les propriétés sont modifiées, et en particulier dont l'activité est améliorée par rapport à celle de la thiorédoxine h isolée du blé.

La présente invention est illustrée sans pour autant être limitée par les exemples qui suivent dans lesquels:

La figure 1 illustre les différences de séquences des thiorédoxines h de blé tendre (THIOBLETA) de blé dur (THIOBLETD), de riz (THIORIZ), d'Arabidopsis (THIOARA), de thiorédoxine h2 de tabac (THIOTABAC2), de thiorédoxine h1 de tabac (THIOTABAC) et de Chlamydomonas reinhardtii (THIOCHLA).

La figure 2 illustre la construction du plasmide pETtrxTa.

Les figures 3 et 4 représentent respectivement un gel de polyacrylamide-SDS après coloration au bleu de Coomassie et un Western-blot effectué avec un anticorps dirigé contre la thiorédoxine h de blé de :

1. lysat de bactéries avant induction,
2. culot des protéines insolubles du lysat après 3h d'induction,

3. culot après chauffage des protéines solubles du lysat,

4. surnageant après chauffage des protéines solubles du lysat,

5 5. comme 2 après 6h d'induction,

6. comme 3 après 6h d'induction,

7. comme 4 après 6h d'induction.

Les figures 5 et 6 représentent schématiquement les plasmides pFL61 et pVT-U 100.

10 EXEMPLE 1: Obtention de clones de thiorédoxine h de blé tendre

1') Construction de la banque d'ADN complémentaire (ADNc).

15 L'extraction des ARN totaux de graines et la sélection des ARN poly (A)<sup>+</sup> ont été effectuées comme décrit par Gautier et al. ( Plant Mol Biol., 14, 313-322, 1990).

20 5µg d'ARN poly (A)<sup>+</sup> issus de graines de Triticum aestivum L., variété capitole en cours de maturation (23 jours après floraison ) ont été utilisés pour construire une banque d'ADN complémentaire, en utilisant le Système Superscript Plasmid commercialisé par BRL.

25 Les ADN complémentaires présentant une taille supérieure à 500 pb sont ligués au plasmide pSPORT1 commercialisé par BRL coupé par les enzymes NotI-SalI, qui est utilisé pour transformer des cellules d'Escherichia coli DH5α.

30 2.10<sup>5</sup> bactéries recombinantes sont obtenues avant amplification de la banque. Environ 3000 recombinants sont étalés et les colonies sont transférées sur une membrane Hybond C (Amersham) selon les instructions du fabricant.

2') Isolement d'un clone codant pour une thiorédoxine h de blé tendre.

La banque d'ADN complémentaire obtenue en 1') est criblée à l'aide d'un mélange d'oligonucléotides de synthèse présentant la séquence ID N° 6 suivante :

5 TGGTGX<sub>1</sub>GGX<sub>2</sub>CCX<sub>3</sub>TGX<sub>4</sub>AAX<sub>5</sub>ATG  
dans laquelle :

X<sub>1</sub> représente C ou T

X<sub>2</sub> représente T ou A

10 X<sub>3</sub> représente A, G, C ou T

X<sub>4</sub> représente C ou T

X<sub>5</sub> représente G ou A

Un mélange contenant ces oligonucléotides synthétiques marqués à leurs extrémités 5' par du gamma-<sup>32</sup>P ATP à l'aide de la polynucléotide kinase T4  
15 a été utilisé.

Les filtres ont été préhybridés (16 heures , 37°C) et hybridés (4 heures, 37°C) dans une solution comprenant 15% (v/v) de formamide désionisé, SSPE 2 X,  
20 solution de Denhardt 5 X, SDS 1 % (poids/volume) et de l'ADN de sperme de saumon dénaturé (200 µg/ml).

Les filtres hybridés sont lavés deux fois dans du SSPE 2 X et du SDS 0,1 % (poids/volume) durant 10 minutes à température ambiante; puis deux fois dans  
25 du SSPE 0,25 X, et du SDS 0,1 % (poids/volume) durant 30 minutes à 37°C puis une fois dans du SSPE 0,25 X durant 10 minutes à 37°C.

Ils sont ensuite exposés à des films sensibles aux rayons X ( Fuji ) à -70°C avec deux écrans intensifiants.  
30

Un clone, appelé pTAM1338, est isolé et sa séquence est déterminée sur les deux brins en utilisant la trousse de séquençage Taq Dye Deoxy

Terminator Cycle Sequencing kit commercialisé par Applied Biosystems et le séquenceur 370 DNA automatique commercialisé par Applied Biosystems.

La séquence de l'ADN complémentaire du clone pTaM1338 est la suivante :  
(SEQ ID N°7)

```

10  CAAAGTGCGC GTGAGAAATA AGCGGTGCTT GCCCAGTAGA GAGAGAGAGA
    GAGAGAGAGA GAGATGGCGG CGTCGGCGGC GACGGCGACG GCGACGGCGG
    CGGCGGTAGG GGCGGGGGAG GTGATCTCCG TCCACAGCCT GGAGCAGTGG
    ACCATGCAGA TCGAGGAGGC CAACGCCGCC AAGAAGCTGG TGGTGATTGA
    CTTCACTGCA TCATGGTGCG GACCATGCCG CATATATGGCT CCAATTTTCG
15  CTGATCTCGC CAAGAAGTTC CCAGCTGCTG TTTTCCTCAA GGTCGACGTT
    GATGAACTGA AGCCCATTCG TGAGCAATTC AGCGTGGAGG CCATGCCAAC
    CTTCTGTTC ATGAAGGAAG GAGATGTCAA GGACAGGGTT GTCGGAGCTA
    TCAAGGAGGA ACTGACGACC AAGGTTGGGC TACACGCGGC CCAGTAATCA
    CCTACCGGAG TAGCATTCGC CTAAATAAAA TTGCCGCTCA ACAAGTAGTG
20  CCTCTAATGG CACCTTATAT CCGTGTTACT GCTTGTTACT TGTTGGTTTA
    TGGATAATGG TGAATCAAGT GTGACTTTAT TCGGTAAATG GTTGATTTTC
    GTAAGGAGCT GATCGAATTC AGTTGTTCGG CTATAGGCAA AAAAAAAAAA
    AAAAAAAAAA
  
```

L'extrémité 5' de cette séquence comprend une  
séquence de 63 paires de bases (pb) non codante,  
suivie d'une phase de lecture ouverte de 381 pb, puis  
d'une séquence non codante de 215 pb, à l'extrémité  
3'.

La phase de lecture ouverte code pour une  
protéine de 127 acides aminés de séquence SEQ ID N°2.

La masse théorique de la protéine codée par  
cette phase de lecture ouverte est de 13524D.

#### EXEMPLE 2:

Obtention de clone de thiorédoxine h de blé dur.

1) Construction de la banque d'ADN  
complémentaire de blé dur.

La banque est obtenue de manière similaire à  
celle de l'exemple 1 à l'exception du matériel végétal



utilisé qui est *Triticum durum* Desf. Variété Agathé.  
Les ARN totaux sont isolés de grains 22 jours après  
floraison.

Les ARN messagers isolés par chromatographie  
5 d'affinité sur oligo dT cellulose sont clonés dans le  
plasmide pUC118 dans le site de clonage PstI.

La souche d'*Escherichia coli* JM109 est  
transformée avec les plasmides obtenus.

La méthode de fabrication de cette banque d'ADN  
10 complémentaire est mise en oeuvre de la manière  
décrite par Gautier et al. (Plant Molecular Biology,  
14, 313-322, 1990) dont la publication est incluse par  
référence à la présente demande.

2. Isolement d'un clone codant pour une  
15 thiorédoxine h de blé dur.

Des clones sont criblés comme indiqué dans  
l'exemple 1 par le même mélange d'oligonucléotides de  
synthèse ( SEQ ID N° 6 ).

Un clone, dénommé pTd14132 est isolé et sa  
20 séquence est déterminée comme indiqué dans l'exemple  
1.

Ce clone comprend la séquence d'ADN  
complémentaire de blé dur suivante :

25 SEQ ID N° 8

CGTGAGAAAT AAGCGGTGCT TGCCAAGCAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG  
ATGGCGGCGG CGGCGACGGC GACGACTACA GCGGCGGCGA CGGCGGCGGC  
GGTGGGGCCG GGGGAGGTGA TCTCCGTCCA CAGCCTGGAG CAGTGGACCA  
30 TGCAGATCGA GGAGGCCAAC GCCGCCAAGA AGCTGGTGGT GATTGACTTC  
ACTGCATCAT GGTGCGGACC ATGCCGCATC ATGGCTCCAA TTTTGTCTGA  
TCTCGCCAAG AAGTTCCCAG CTGCTGTTTT CCTCAAGGTC GACGTTGATG  
AACTGAAGCC CATTGCTGAG CAATTCAGCG TCGAGGCCAT GCCAACCTTC  
CTGTTTCATGA AGGAAGGAGA CGTCAAGGAC AGGGTTGTCTG GAGCTATCAA

GGAGGAGCTG ACGACCAAGG TTGGGCTCCA CGCGGCTGCC TAGTAATCAC  
 CTAGCGGAGT AGTATTCGCC TAAATAAAAT TGCCGCTTGA GAAGTAGTGC  
 CTCCAATGGC ACCGGATATG CTGTGTACTG CTTGCTTCTT GTGAGTTTAT  
 GGATGATGGT GAATCAAGTG TGACTTTATT CGGTAAATGG TTGATTTTCAT  
 5 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

L'extrémité 5' de cette séquence comprend une partie non codante de 50 bp, puis une phase de lecture ouverte de 390 pb puis une partie non codante de 190 pb à son extrémité 3'.

10 La phase de lecture ouverte correspond à une protéine de 130 acides aminés, ayant une masse moléculaire théorique de 13750D.

#### EXEMPLE 3:

15 Comparaison des structures primaires des thiorédoxines h de blés dur et tendre et des autres thiorédoxines h divulguées dans l'état de la technique.

Les structures primaires des deux protéines correspondant aux clones pTaM1338 et pTd14132 ont été comparées entre elles et aux structures primaires de thiorédoxines h de riz ( THIORIZ), de thiorédoxine h d'Arabidopsis (THIOARA) , de thiorédoxine h2 de tabac (THIOTABAC 2), de thiorédoxine h1 de tabac (THIOTABAC) et de thiorédoxine h de Chlamydomonas reinhardtii (THIOCHLA).

25 Les résultats de ces comparaisons sont repris dans la figure 1.

Dans cette figure les acides aminés sont représentés par le code à une lettre et (\*) représente une position d'acide aminé identique dans les sept protéines, tandis que (.) représente une position d'acide aminé similaire.

30 Sur une longueur totale de 138 acides aminés, on observe une conservation à l'identique pour 31

acides aminés (22,5 %) et une similarité pour 42 acides aminés (30,4 %).

Il ressort donc clairement de cette figure que les thiorédoxines h de blés montrent une faible  
5 identité de séquence avec les autres thiorédoxines h de végétaux déjà séquencés.

De manière surprenante, l'identité de séquence entre d'une part la thiorédoxine h de riz et d'autre part les thiorédoxines h de blé tendre et de blé dur  
10 n'est que de respectivement 54,9% et 55,7 %, alors que ces plantes sont toutes trois des graminées.

#### EXEMPLE 4:

##### Production de thiorédoxine h par des bactéries.

1. Sous-clonage de la séquence codant pour la  
15 thiorédoxine h de blé tendre dans un vecteur d'expression d'E.coli:

Le DNA plasmidique pTAM1338 contenant la séquence d'ADNc codant pour la thiorédoxine h de blé tendre (*Triticum aestivum*) a été modifié par  
20 mutagénèse dirigée pour introduire les sites de restriction NdeI et BamHI respectivement en 5' et 3' de la séquence codant pour la protéine.

Ces sites de restriction ont ensuite servi à introduire la séquence codant pour la thiorédoxine h de blé tendre (*Triticum aestivum*) dans le vecteur  
25 d'expression pET3b commercialisé par Novagen (USA) et décrit par Rosenberg et al., (Gene, 56, 125-135, 1987) digéré par les mêmes enzymes.

La figure 2 illustre cette construction.

30 Le vecteur pET3b est une molécule d'ADN circulaire dérivé de pBR322; il contient les éléments suivants :

- le promoteur du gène 10 reconnu par l'ARN

polymérase T7 (appelé PO10) contenu entre les sites de restriction BglII et XbaI,

- la séquence Shine-Dalgarno du gène 10,
- un codon d'initiation ATG contenu dans le
- 5 site unique de restriction NdeI en 5' des premiers codons du gène 10,
- un site de restriction unique BamHI qui permet de cloner une séquence d'un gène étranger dans le vecteur d'expression,
- 10 - le terminateur de transcription qui suit normalement le gène 10(TO).

Ce vecteur possède le replicon pMB1 (ori) et contient le gène bla qui code pour la résistance à l'ampicilline (ampR).

- 15 La séquence codant pour la thiorédoxine h de blé tendre incluse entre les sites de restriction NdeI et BamHI qui ont été créés par mutagénèse dirigée est introduite dans le vecteur d'expression digéré par les mêmes enzymes.

- 20 Le vecteur résultant pETtrxTa est utilisé pour transformer des souches d'E. coli.

Les méthodes conventionnelles de clonage ont été utilisées. Elles sont décrites par Maniatis et al. (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

- 25 Le plasmide pETtrxTa résultant de la construction a été séquencé comme décrit par Sanger et al. (1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467), dans le but de vérifier qu'aucune mutation n'a été
- 30 introduite dans la séquence de la thiorédoxine h au cours de l'amplification ou du clonage.

La séquence codant pour la thiorédoxine h peut aussi être introduite dans le vecteur d'expression

après modification, par mutagénèse dirigée, d'un ou plusieurs acides aminés de la protéine dans le but de changer ses propriétés. Les méthodes conventionnelles de mutagénèse dirigée sont décrites par Maniatis et  
5 al. (1982, précédemment cité).

2. Obtention de bactéries produisant de la thiorédoxine h:

Le vecteur pETtrxTa qui contient la séquence codant pour la thiorédoxine h de blé sous contrôle du  
10 promoteur reconnu par l'ARN polymérase du bactériophage T7 est utilisé pour transformer des souches d'E. coli (Hanahan et al., 1985, Technique for transformation of E. coli in "DNA Cloning: A practical Approach "(Glover , D.M.Ed. Vol.1, pp 109-135, IRL  
15 Press, Oxford), capables de synthétiser l'ARN polymérase T7. De telles souches sont commercialisées par Novagen (USA) et décrites par Studier et al., (1990, Methods Enzymol. 185, 60-89). Elles peuvent être:

20 -BL21 (DE3): ompT hsdS gal ( lambda cIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 genel),

-BL21 (DE3)pLysE: même génotype que BL21 (DE3) excepté le plasmide pLysE qui dérive du plasmide PACYC184 (Chang et al., 1978 , J.Bacteriol. 134-1141)  
25 et contient le gène codant pour le lysozyme T7 ainsi que le gène de résistance au chloramphénicol. Le gène codant pour le lysozyme est exprimé à partir du promoteur tet de pACYC184 ce qui signifie que les bactéries qui portent ce plasmide accumulent un taux  
30 important de lysozyme.

-BL21 (DE3)pLysS: même génotype que BL21 (DE3)pLysE mais le gène codant pour le lysozyme est inséré dans l'orientation opposée. En conséquence, les

bactéries qui portent ce plasmide accumulent une quantité beaucoup plus faible de lysozyme.

Les bactéries transformées sont multipliées dans le milieu de Luria-Bertani avec les antibiotiques  
5 nécessaires, à 30°C.

3. Analyse de l'expression de la thiorédoxine h dans les bactéries.

Les bactéries contenant le vecteur pETtrxTa sont cultivées jusqu'à une densité optique comprise  
10 entre 0,3 et 0,6 à 600 nm, (une fraction aliquote avant induction est conservée pour analyse). L'inducteur de l'expression de l'ARN polymérase T7 (IPTG 0.1 mM) est alors ajouté au milieu de culture pour permettre l'expression de la thiorédoxine h et  
15 les bactéries sont collectées par centrifugation après 3 ou 6 h d'induction.

Les bactéries induites sont lysées par les méthodes conventionnelles et le lysat contenant les protéines totales est centrifugé pour séparer la  
20 fraction "protéines insolubles" (culot) de celle des "protéines solubles" (surnageant).

Le surnageant qui contient l'activité thiorédoxine h, identifiée par dosage de la réduction de la malate déshydrogénase comparable au témoin  
25 extrait de blé, est chauffé à 60°C (5 min.) et centrifugé pour séparer la fraction des protéines thermostables (surnageant) des autres protéines.

Les échantillons des différentes fractions sont traités avec le tampon de charge de Laemmli (Laemmli, 1970, Nature, 227, 680-685), chauffé 5 à 10 minutes  
30 dans un bain marie bouillant et analysé par gel de sodium dodécyl sulfate-polyacrylamide.

Une protéine de la taille attendue pour une

thiorédoxine h de blé est présente dans le lysat des protéines totales de bactéries induites et reste soluble même après chauffage à 60°C; le même gel est transféré sur une membrane de nitrocellulose (Towbin et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 435P-4354), et incubé avec un anticorps dirigé contre la thiorédoxine h de blé. La protéine, de taille attendue, synthétisée dans le cytoplasme bactérien après induction, réagit avec l'anticorps.

Les figures 3 et 4 représentent respectivement un gel de polyacrylamide-SDS après coloration au bleu de Coomassie et un Western-Blot effectué avec un anticorps dirigé contre la thiorédoxine h de blé, de :

1. lysat de bactéries avant induction,
2. culot des protéines insolubles du lysat après 3h d'induction,
3. culot après chauffage des protéines solubles du lysat,
4. surnageant après chauffage des protéines solubles du lysat,
5. comme 2 après 6h d'induction,
6. comme 3 après 6h d'induction,
7. comme 4 après 6h d'induction.

#### 4. Purification de la thiorédoxine h de blé.

Les conditions de purification utilisées suivent essentiellement le protocole décrit par de Lamotte-Guéry et al., ((1991) Eur. J. Biochem. 196, 287-294). Les bactéries sont récoltées après induction de 4h selon les conditions décrites plus haut et resuspendues dans un tampon 30 mM Tris/HCl pH 7,9 et 1 mM EDTA (tampon A).

Après un cycle de congélation (-20°C)/décongélation les cellules sont lysées avec une

presse de French et le lysat ainsi obtenu est centrifugé à 4°C, 30 minutes à 50 000 g pour récupérer la fraction surnageante qui est ensuite chauffée à 60°C, 5 minutes.

5 Les protéines dénaturées par le traitement à chaud sont centrifugées comme précédemment. Le surnageant contient principalement la thiorédoxine h. Elle peut être purifiée par précipitation au sulfate d'ammonium (35-80 %) suivie d'une chromatographie  
10 d'exclusion (Sephadex G-50) et d'une chromatographie échangeuse d'ions (Q-Hyper D).

Cette dernière chromatographie est réalisée avec un gradient de 0 à 200 mM NaCl, la thiorédoxine h de blé produite dans E.coli est éluée à une  
15 concentration de 90 mM NaCl. La mesure de l'activité de la thiorédoxine h (mesure de l'activation de la malate déshydrogénase à NADP selon Jacquot et al. ((1981), Plant Physiol., 68, 300-304) à chaque étape aide à suivre la purification.

20 EXEMPLE 5 : Production de thiorédoxine h par des levures.

1. Construction de pFL61trxTa:

Le fragment correspondant à la séquence codante de pTaM1388 est amplifié en utilisant deux  
25 oligonucléotides de synthèse s'hybridant aux régions 15-34 et 482-502 et un site de restriction NotI est ajouté à chaque extrémité.

Le fragment résultant est inséré dans le vecteur pFL61 représenté sur la figure 5 ( Lacroute,  
30 (1992) Plant J.2 (3), 417-422) préalablement linéarisé par NotI.

Le sens d'insertion et la séquence sont contrôlés. Le vecteur résultant est appelé pFL61trxTa.



## 2. Construction de pVTUtrxTa:

La séquence de l'ADNc codant pour la thiorédoxine h de blé tendre issue de pTAM1338 est isolée après digestion par BamHI et NdeI du plasmide pETtrxTa (plasmide pET portant la séquence codante de pTAM1338) puis insérée dans le vecteur pVTUtrxTa représenté sur la figure 6, (Vernet et al. (1987) Gene 52, 225-233 ) au niveau du site de clonage Pvu II. Le vecteur résultant est appelé pVTUtrxTa.

## 3. Conditions de purification:

Les levures (souche OLI et YPH 250) sont transformées par pVTUtrxTa et sont cultivées en milieu liquide à 30°C et en conditions sélectives, permettant le maintien des plasmides dans les cellules jusqu'à une absorbance à 550 nm de 1, puis sont transférées en milieu riche pendant 16 heures.

Ceci permet d'augmenter la biomasse et le faible nombre de divisions ayant lieu pendant cette durée de temps limite les effets de perte de plasmide. Les cellules sont ensuite cassées par passage dans un broyeur à billes ou par incubation dans de l'ammoniaque. Les conditions de purification de la protéine recombinante à partir du lysat cellulaire sont celles décrites par de Lamotte et al. (1991). Eur. J. Biochem. 196, 287-294).

Les deux souches de levures transformées produisent des thiorédoxines h décelables par immunoempreintes.

La souche YPH252 déposée à l'ATCC peut aussi être utilisée.

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATION GENERALE:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: Institut National de la Recherche Agronomique  
INRA
- (B) RUE: 147 rue de l'université
- (C) VILLE: Paris
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 75348

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Thiorédoxines h de blé tendre et de blé dur  
et protéines présentant des similitudes; fragments d'ADN  
codant pour ces protéines et procédés d'obtention

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 8

## (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D'EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 109 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Triticum aestivum

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Gly	Glu	Val	Ile	Ser	Val	His	Ser	Leu	Glu	Gln	Trp	Thr	Met	Gln	Ile
1				5				10						15	
Glu	Glu	Ala	Asn	Ala	Ala	Lys	Lys	Leu	Val	Val	Ile	Asp	Phe	Thr	Ala
			20					25					30		
Ser	Trp	Cys	Gly	Pro	Cys	Arg	Ile	Met	Ala	Pro	Ile	Phe	Ala	Asp	Leu
		35				40						45			
Ala	Lys	Lys	Phe	Pro	Ala	Ala	Val	Phe	Leu	Lys	Val	Asp	Val	Asp	Glu
		50				55					60				
Leu	Lys	Pro	Ile	Ala	Glu	Gln	Phe	Ser	Val	Glu	Ala	Met	Pro	Thr	Phe
65					70					75				80	

Leu Phe Met Lys Glu Gly Asp Val Lys Asp Arg Val Val Gly Ala Ile  
85 90 95

Lys Glu Glu Leu Thr Thr Lys Val Gly Leu His Ala Ala  
100 105

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 384 paires de bases  
(B) TYPE: acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS: deux  
(D) CONFIGURATION: linéaire

## (11) TYPE DE MOLECULE: ADNC pour ARNm

(111) HYPOTHETIQUE: NON

(v1) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Triticum aestivum*

## (1x) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS  
(B) EMPLACEMENT: 1..381

(x1) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

ATG Met 1	GCG Ala	GCG Ala	TCG Ser	GCG Ala 5	GCG Ala	ACG Thr	GCG Ala	ACG Thr	GCG Ala 10	ACG Thr	GCG Ala	GCG Ala	GCG Ala	GTA Val 15	GGG Gly	48
GCG Ala	GGG Gly	GAG Glu	GTG Val 20	ATC Ile	TCC Ser	GTC Val	CAC His	AGC Ser 25	CTG Leu	GAG Glu	CAG Gln	TGG Trp	ACC Thr 30	ATG Met	CAG Gln	96
ATC Ile	GAG Glu 35	GAG Glu	GCC Ala	AAC Asn	GCC Ala	GCC Ala	AAG Lys 40	AAG Lys	CTG Leu	GTG Val	GTG Val	ATT Ile 45	GAC Asp	TTC Phe	ACT Thr	144
GCA Ala 50	TCA Ser	TGG Trp	TGC Cys	GGA Gly	CCA Pro	TGC Cys 55	CGC Arg	ATT Ile	ATG Met	GCT Ala	CCA Pro 60	ATT Ile	TTC Phe	GCT Ala	GAT Asp	192
CTC Leu 65	GCC Ala	AAG Lys	AAG Lys	TTC Phe	CCA Pro 70	GCT Ala	GCT Ala	GTT Val	TTC Phe	CTC Leu 75	AAG Lys	GTC Val	GAC Asp	GTT Val	GAT Asp 80	240
GAA Glu	CTG Leu	AAG Lys	CCC Pro	ATT Ile 85	GCT Ala	GAG Glu	CAA Gln	TTC Phe	AGC Ser 90	GTG Val	GAG Glu	GCC Ala	ATG Met	CCA Pro 95	ACC Thr	288
TTC Phe	CTG Leu	TTC Phe	ATG Met 100	AAG Lys	GAA Glu	GGA Gly	GAT Asp	GTC Val 105	AAG Lys	GAC Asp	AGG Arg	GTT Val	GTC Val 110	GGA Gly	GCT Ala	336

ATC AAG GAG GAA CTG ACG ACC AAG GTT GGG CTA CAC GCG GCC CAG 381  
 Ile Lys Glu Glu Leu Thr Thr Lys Val Gly Leu His Ala Ala Gln  
           115                                  120                                  125

TAA

384

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

## (1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 127 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Met Ala Ala Ser Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly  
   1                                  5                                  10                                  15  
 Ala Gly Glu Val Ile Ser Val His Ser Leu Glu Gln Trp Thr Met Gln  
                                   20                                  25                                  30  
 Ile Glu Glu Ala Asn Ala Ala Lys Lys Leu Val Val Ile Asp Phe Thr  
                                   35                                  40                                  45  
 Ala Ser Trp Cys Gly Pro Cys Arg Ile Met Ala Pro Ile Phe Ala Asp  
                                   50                                  55                                  60  
 Leu Ala Lys Lys Phe Pro Ala Ala Val Phe Leu Lys Val Asp Val Asp  
   65                                  70                                  75                                  80  
 Glu Leu Lys Pro Ile Ala Glu Gln Phe Ser Val Glu Ala Met Pro Thr  
                                   85                                  90                                  95  
 Phe Leu Phe Met Lys Glu Gly Asp Val Lys Asp Arg Val Val Gly Ala  
                                   100                                  105                                  110  
 Ile Lys Glu Glu Leu Thr Thr Lys Val Gly Leu His Ala Ala Gln  
                                   115                                  120                                  125

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

## (1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 393 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: deux
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

## (iii) HYPOTHETIQUE: NON

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Triticum durum

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:  
 (A) NOM/CLE: CDS  
 (B) EMPLACEMENT: 1..390

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

ATG GCG GCG GCG GCG ACG GCG ACG ACT ACA GCG GCG GCG ACG GCG GCG	48
Met Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Thr Thr Thr Ala Ala Ala Thr Ala Ala	
1 5 10 15	
GCG GTG GGG CCG GGG GAG GTG ATC TCC GTC CAC AGC CTG GAG CAG TGG	96
Ala Val Gly Pro Gly Glu Val Ile Ser Val His Ser Leu Glu Gln Trp	
20 25 30	
ACC ATG CAG ATC GAG GAG GCC AAC GCC GCC AAG AAG CTG GTG GTG ATT	144
Thr Met Gln Ile Glu Glu Ala Asn Ala Ala Lys Lys Leu Val Val Ile	
35 40 45	
GAC TTC ACT GCA TCA TGG TGC GGA CCA TGC CGC ATC ATG GCT CCA ATT	192
Asp Phe Thr Ala Ser Trp Cys Gly Pro Cys Arg Ile Met Ala Pro Ile	
50 55 60	
TTT GCT GAT CTC GCC AAG AAG TTC CCA GCT GCT GTT TTC CTC AAG GTC	240
Phe Ala Asp Leu Ala Lys Lys Phe Pro Ala Ala Val Phe Leu Lys Val	
65 70 75 80	
GAC GTT GAT GAA CTG AAG CCC ATT GCT GAG CAA TTC AGC GTC GAG GCC	288
Asp Val Asp Glu Leu Lys Pro Ile Ala Glu Gln Phe Ser Val Glu Ala	
85 90 95	
ATG CCA ACC TTC CTG TTC ATG AAG GAA GGA GAC GTC AAG GAC AGG GTT	336
Met Pro Thr Phe Leu Phe Met Lys Glu Gly Asp Val Lys Asp Arg Val	
100 105 110	
GTC GGA GCT ATC AAG GAG GAG CTG ACG ACC AAG GTT GGG CTC CAC GCG	384
Val Gly Ala Ile Lys Glu Glu Leu Thr Thr Lys Val Gly Leu His Ala	
115 120 125	
GCT GCC TAG	393
Ala Ala	
130	

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 130 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

```

Met Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Thr Thr Ala Ala Ala Thr Ala Ala
 1           5           10           15
Ala Val Gly Pro Gly Glu Val Ile Ser Val His Ser Leu Glu Gln Trp
          20           25           30
Thr Met Gln Ile Glu Glu Ala Asn Ala Ala Lys Lys Leu Val Val Ile
          35           40           45
Asp Phe Thr Ala Ser Trp Cys Gly Pro Cys Arg Ile Met Ala Pro Ile
 50           55           60
Phe Ala Asp Leu Ala Lys Lys Phe Pro Ala Ala Val Phe Leu Lys Val
 65           70           75
Asp Val Asp Glu Leu Lys Pro Ile Ala Glu Gln Phe Ser Val Glu Ala
          85           90           95
Met Pro Thr Phe Leu Phe Met Lys Glu Gly Asp Val Lys Asp Arg Val
          100          105          110
Val Gly Ala Ile Lys Glu Glu Leu Thr Thr Lys Val Gly Leu His Ala
          115          120          125
Ala Ala
          130

```

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 21 bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: un
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

## (iii) HYPOTHETIQUE: NON

## (v) TYPE DU FRAGMENT: interne

## (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: variation
- (B) EMPLACEMENT: replace(6, "t")
- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:
  - (A) NOM/CLE: variation
  - (B) EMPLACEMENT: replace(9, "a")
- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:
  - (A) NOM/CLE: mutation
  - (B) EMPLACEMENT: replace(12, "g")
- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:
  - (A) NOM/CLE: mutation
  - (B) EMPLACEMENT: replace(12, "c")
- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:
  - (A) NOM/CLE: mutation
  - (B) EMPLACEMENT: replace(12, "t")
- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:
  - (A) NOM/CLE: mutation
  - (B) EMPLACEMENT: replace(15, "t")
- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:
  - (A) NOM/CLE: mutation
  - (B) EMPLACEMENT: replace(18, "a")
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

TGGTGCGGTC CATGCAAGAT G

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 659 paires de bases  
 (B) TYPE: acide nucléique  
 (C) NOMBRE DE BRINS: deux  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC pour ARNm

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

- (vi) ORIGINE:  
 (A) ORGANISME: *Triticum aestivum*

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

CAAAGTGGCG	GTGAGAAATA	AGCGGTGCTT	GCCCAGTAGA	GAGAGAGAGA	GAGAGAGAGA	60
GAGATGGCGG	CGTCGGCGGC	GACGGGACG	GCGACGGCGG	CGGCGGTAGG	GGCGGGGGAG	120
GTGATCTCCG	TCCACAGCCT	GGAGCAGTGG	ACCATGCAGA	TCGAGGAGGC	CAACGCCGCC	180
AAGAAGCTGG	TGGTGATTGA	CTTCACTGCA	TCATGGTGCG	GACCATGCCG	CATTATGGCT	240
CCAATTTTCG	CTGATCTCGC	CAAGAAGTTC	CCAGCTGCTG	TTTTCTCAA	GGTCGACGTT	300
GATGAAGTGA	AGCCCATTGC	TGAGCAATTC	AGCGTGGAGG	CCATGCCAAC	CTTCCTGTTC	360
ATGAAGGAAG	GAGATGTCAA	GGACAGGGTT	GTCGGAGCTA	TCAAGGAGGA	ACTGACGACC	420
AAGGTTGGGC	TACACGCGGC	CCAGTAATCA	CCTACCGGAG	TAGCATTCGC	CTAAATAAAA	480
TTGCCGCTCA	ACAAGTAGTG	CCTCTAATGG	CACCTTATAT	CCTGTGTACT	GCTTGTTACT	540
TGTTGGTTTA	TGGATAATGG	TGAATCAAGT	GTGACTTTAT	TCGGTAAATG	GTTGATTTTC	600
GTAAGGAGCT	GATCGAATTC	AGTTGTTCCG	CTATAGGCAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	659

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 630 paires de bases  
 (B) TYPE: acide nucléique  
 (C) NOMBRE DE BRINS: deux  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC pour ARNm

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

- (vi) ORIGINE:  
 (A) ORGANISME: *Triticum durum*



## (x1) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

CGTGAGAAAT AAGCGGTGCT TGCCAAGCAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG ATGGCGGCGG	60
CGGCGACGGC GACGACTACA GCGGCGGCGA CGGCGGCGGC GGTGGGGCCG GGGGAGGTGA	120
TCTCCGTCCA CAGCCTGGAG CAGTGGACCA TGCAGATCGA GGAGGCCAAC GCCGCCAAGA	180
AGCTGGTGGT GATTGACTTC ACTGCATCAT GGTGCGGACC ATGCCGCATC ATGGCTCCAA	240
TTTTTGCTGA TCTCGCCAAG AAGTTCCCAG CTGCTGTTTT CCTCAAGGTC GACGTTGATG	300
AACTGAAGCC CATTGCTGAG CAATTCAGCG TCGAGGCCAT GCCAACCTTC CTGTTCATGA	360
AGGAAGGAGA CGTCAAGGAC AGGGTTGTCTG GAGCTATCAA GGAGGAGCTG ACGACCAAGG	420
TTGGGCTCCA CGCGGCTGCC TAGTAATCAC CTAGCGGAGT AGTATTCGCC TAAATAAAAT	480
TGCCGCTTGA GAAGTAGTGC CTCCAATGGC ACCGGATATG CTGTGTACTG CTTGCTTCTT	540
GTGAGTTTAT GGATGATGGT GAATCAAGTG TGACTTTATT CGGTAAATGG TTGATTCAT	600
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	630

REVENDICATIONS

1. Protéine présentant une similitude de séquence d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N° 1 suivante :

5

Gly Glu Val Ile Ser Val His Ser Leu Glu Gln Trp Thr  
Met Gln Ile Glu Glu Ala Asn Ala Ala Lys Lys Leu Val  
Val Ile Asp Phe Thr Ala Ser Trp Cys Gly Pro Cys Arg  
Ile Met Ala Pro Ile Phe Ala Asp Leu Ala Lys Lys Phe  
10 Pro Ala Ala Val Phe Leu Lys Val Asp Val Asp Glu Leu  
Lys Pro Ile Ala Glu Gln Phe Ser Val Glu Ala Met Pro  
Thr Phe Leu Phe Met Lys Glu Gly Asp Val Lys Asp Arg  
Val Val Gly Ala Ile Lys Glu Glu Leu Thr Thr Lys Val  
Gly Leu His Ala Ala

15

2. Protéine selon la revendication 1 caractérisée en ce qu'elle présente une similitude de séquence avec la séquence SEQ ID N°1 d'au moins 75 % et préférentiellement d'au moins 85 %.

20

3. Thiorédoxine h de blé tendre selon l'une des revendications 1 et 2 présentant la séquence suivante: SEQ ID N°3

25

Met Ala Ala Ser Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala  
Ala Val Gly Ala Gly Glu Val Ile Ser Val His Ser Leu  
25 Glu Gln Trp Thr Met Gln Ile Glu Glu Ala Asn Ala Ala  
Lys Lys Leu Val Val Ile Asp Phe Thr Ala Ser Trp Cys  
Gly Pro Cys Arg Ile Met Ala Pro Ile Phe Ala Asp Leu  
Ala Lys Lys Phe Pro Ala Ala Val Phe Leu Lys Val Asp  
Val Asp Glu Leu Lys Pro Ile Ala Glu Gln Phe Ser Val  
30 Glu Ala Met Pro Thr Phe Leu Phe Met Lys Glu Gly Asp  
Val Lys Asp Arg Val Val Gly Ala Ile Lys Glu Glu Leu  
Thr Thr Lys Val Gly Leu His Ala Ala Gln

4. Thiorédoxine h de blé dur selon l'une des revendications 1 et 2 présentant la séquence suivante:  
SEQ ID N°5

5 Met Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Thr Thr Ala Ala Ala  
Thr Ala Ala Ala Val Gly Pro Gly Glu Val Ile Ser Val  
His Ser Leu Glu Gln Trp Thr Met Gln Ile Glu Glu Ala  
Asn Ala Ala Lys Lys Leu Val Val Ile Asp Phe Thr Ala  
Ser Trp Cys Gly Pro Cys Arg Ile Met Ala Pro Ile Phe  
10 Ala Asp Leu Ala Lys Lys Phe Pro Ala Ala Val Phe Leu  
Lys Val Asp Val Asp Glu Leu Lys Pro Ile Ala Glu Gln  
Phe Ser Val Glu Ala Met Pro Thr Phe Leu Phe Met Lys  
Glu Gly Asp Val Lys Asp Arg Val Val Gly Ala Ile Lys  
Glu Glu Leu Thr Thr Lys Val Gly Leu His Ala Ala Ala

15 5. Peptide comprenant au moins un fragment  
d'une des protéines selon l'une des revendications 1  
et 4.

6. Fragment d'ADN codant pour une des protéines  
selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou un  
20 des peptides selon la revendication 5.

7. Fragment selon la revendication 6 codant  
pour la thiorédoxine h de blé tendre, caractérisé en  
ce qu'il comprend la séquence suivante :

SEQ ID N°2

25 ATGGCGGCGT CGGCGGCGAC GGCGACGGCG ACGGCGGCGG CGGTAGGGGC  
GGGGGAGGTG ATCTCCGTCC ACAGCCTGGA GCAGTGGACC ATGCAGATCG  
AGGAGGCCAA CGCCGCCAAG AAGCTGGTGG TGATTGACTT CACTGCATCA  
TGGTGCGGAC CATGCCGCAT TATGGCTCCA ATTTTCGCTG ATCTCGCCAA  
30 GAAGTTCCCA GCTGCTGTTT TCCTCAAGGT CGACGTTGAT GAACTGAAGC  
CCATTGCTGA GCAATTCAGC GTGGAGGCCA TGCCAACCTT CCTGTTCATG  
AAGGAAGGAG ATGTCAAGGA CAGGGTTGTC GGAGCTATCA AGGAGGAACT  
GACGACCAAG GTTGGGCTAC ACGCGGCCCA GTAA

8. Fragment selon la revendication 6 codant pour la thiorédoxine h de blé dur, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence suivante :

SEQ ID N° 4

5

ATGGCGGCGG CGGCGACGGC GACGACTACA GCGGCGGCGA CGGCGGCGGC  
GGTGGGGCCG GGGGAGGTGA TCTCCGTCCA CAGCCTGGAG CAGTGGACCA  
TGCAGATCGA GGAGGCCAAC GCCGCCAAGA AGCTGGTGGT GATTGACTTC  
ACTGCATCAT GGTGCGGACC ATGCCGCATC ATGGCTCCAA TTTTGTCTGA  
10 TCTCGCCAAG AAGTTCCCAG CTGCTGTTTT CCTCAAGGTC GACGTTGATG  
AACTGAAGCC CATTGCTGAG CAATTCAGCG TCGAGGCCAT GCCAACCTTC  
CTGTTCATGA AGGAAGGAGA CGTCAAGGAC AGGGTTGTCTG GAGCTATCAA  
GGAGGAGCTG ACGACCAAGG TTGGGCTCCA CGCGGCTGCC TAG

9. Vecteur nucléotidique portant un fragment d'ADN selon l'une des revendications 6 à 8.

10. Vecteur appelé pETtrxTa selon la revendication 9 portant la séquence SEQ ID N°2, déposé auprès de la CNCM sous le n° I-1442.

11. Vecteur appelé pFL6ltrxTa selon la revendication 9 portant la séquence SEQ ID N°2, déposé auprès de la CNCM sous le n° I-1443.

12. Microorganisme portant un vecteur selon l'une des revendications 9 à 11.

13. Microorganisme selon la revendication 12 caractérisé en ce qu'il est une bactérie ou une levure.

14. Méthode de sélection dans une banque d'ADN complémentaires de clones codant pour une thiorédoxine h caractérisée en ce que l'on hybride lesdits clones avec une sonde présentant une similitude de séquences proche de 100 % avec le site actif des thiorédoxines.

15. Méthode selon la revendication 14 caractérisée en ce que ladite sonde présente la

séquence suivante :

SEQ ID N°6

TGGTGX<sub>1</sub>GGX<sub>2</sub>CCX<sub>3</sub>TGX<sub>4</sub>AAX<sub>5</sub>ATG

dans laquelle :

- 5           X<sub>1</sub> représente C ou T  
          X<sub>2</sub> représente T ou A  
          X<sub>3</sub> représente A, G, C ou T  
          X<sub>4</sub> représente C ou T  
          X<sub>5</sub> représente G ou A

10           16. Procédé de production de protéines et de peptides selon l'une des revendications 1 à 5 , et en particulier de thiorédoxines h comprenant les étapes suivantes :

- 15           - culture d'un microorganisme selon l'une des revendications 12 et 13 , et  
          - isolement des protéines ou peptides selon l'une des revendications 1 à 5 produits par ledit microorganisme.

20           17. Procédé selon la revendication 16 caractérisé en ce que les microorganismes sont lysés après culture.

25           18. Plante transgénique caractérisée en ce qu'elle porte un fragment d'ADN selon l'une des revendications 6 à 8.

THIOBLETA	MAASAA---TATATAA AVGAGEVISVHSLEQWTMQIEEANA AKKL VVIDFTASWC	52
THIOBLETD	MAAAATATTTAAATAA AVGPGEVISVHSLEQWTMQIEEANA AKKL VVIDFTASWC	55
THIORIZ	MAA-----EE-----GVVIACHNKDEFDAQMTKAKEAGKVVIIDFTASWC	40
THIOARA	MA-----SEE-----GQVIACHTVETWNEQLQKANESKTLVVVDFTASWC	40
THIOTABAC2	MA-----EE-----GQVIGVHTVDAWNEHLQKGIDDKKLIVVDFTASWC	39
THIOTABAC	MAANDATSSEE-----GQVFGCHKVEEWNEYFKKGVETKKLVVVDFTASWC	46
THIOCHLA	-----GGSVIVIDSKAAWDAQLAKGKEEHKPIVVDFTATWC	36
	* * * * *	
THIOBLETA	GPCRIMAPIFADLAKKFPA-AVFLKVDVDELKP IAEQFSVEAMPTFLFMKEGDVK	106
THIOBLETD	GPCRIMAPIFADLAKKFPA-AVFLKVDVDELKP IAEQFSVEAMPTFLFMKEGDVK	109
THIORIZ	GPCRFIAPVFAEYAKKFPG-AVFLKVDVDELKEVAEKYNVEAMPTFLFIKDGAEA	94
THIOARA	GPCRFIAPFFADLAKKLPN-VLFLKVDVDELKSVASDWAIQAMPTFMFLKEGKIL	94
THIOTABAC2	GPKCFIASFYAELAKKMPT-VTFLKVDVDELKSVATDWAVEAMPTFMFLKEGKIV	93
THIOTABAC	GPCRFIAPILADIAKKMPH-VIFLKVDVDELKTVSAEWSVEAMPTFVFIKDGKEV	100
THIOCHLA	GPKMIAPLFETLSNDYAGKVI FLKVDVDAVA AEAAGITAMPTFHVYKDGVKA	91
	*** . * * * * * . * * * * *	
THIOBLETA	DRVVGAIKEELTTKVGLHAAQ-----	127
THIOBLETD	DRVVGAIKEELTTKVGLHAAA-----	130
THIORIZ	DKVVGARKDDLQNTIVKHVGATAASASA	122
THIOARA	DKVVGAKKDELQSTIAKHL-----A	114
THIOTABAC2	DKVVGAKKDELQQTIAKHISST--S-TA	118
THIOTABAC	DRVVGAKKEELQQTIVKHAAPA--TVTA	126
THIOCHLA	DDLVGASQDKLKALVAKHAAA-----	112
	* . * * * . * . *	

FIG. 1

2/5

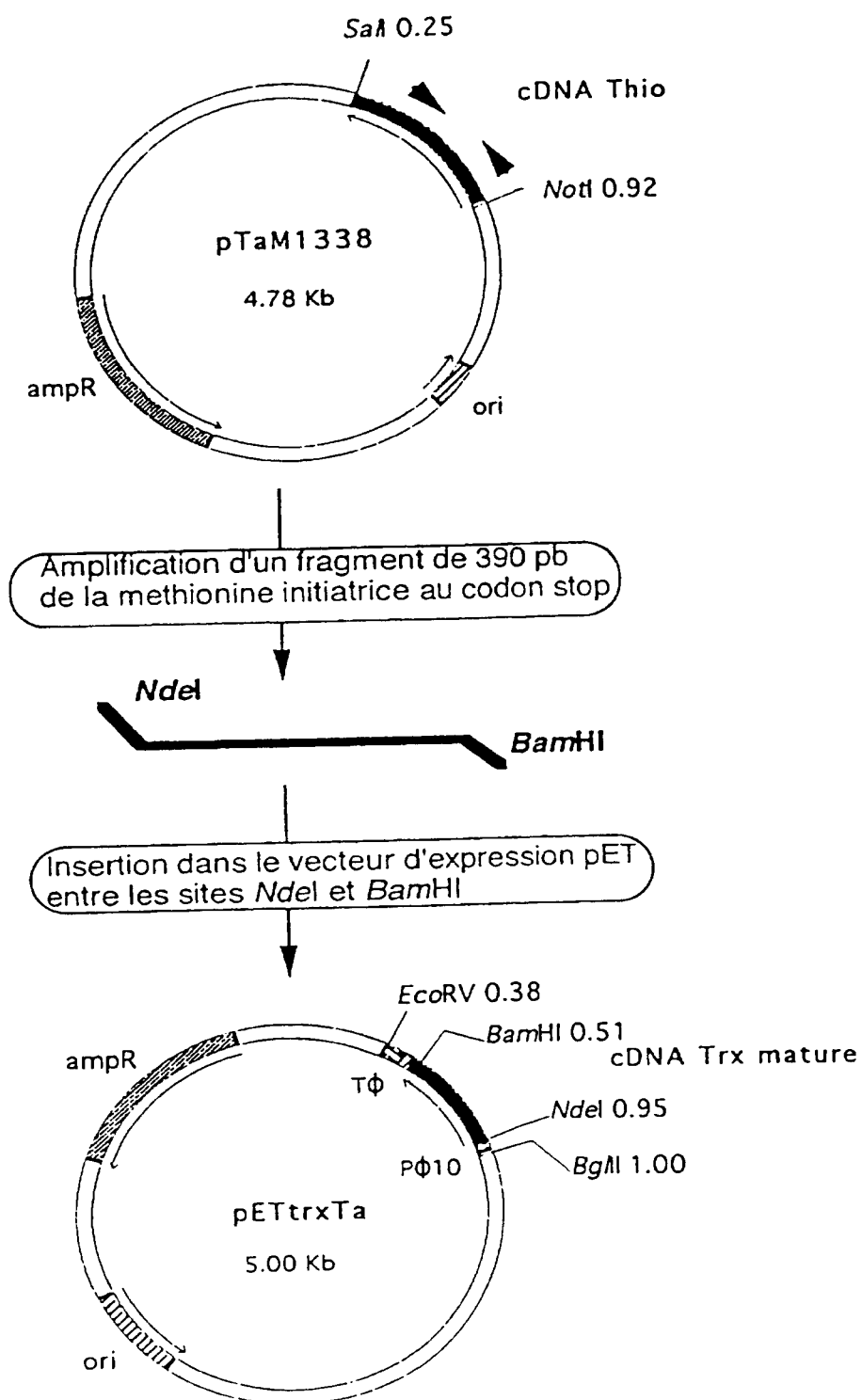


FIG. 2

3/5

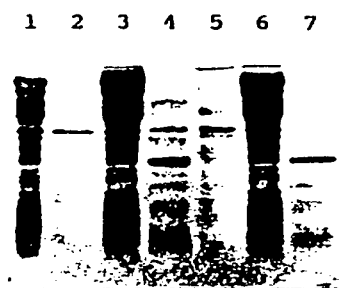


FIG. 3

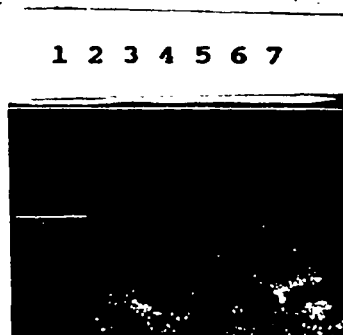


FIG. 4

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)



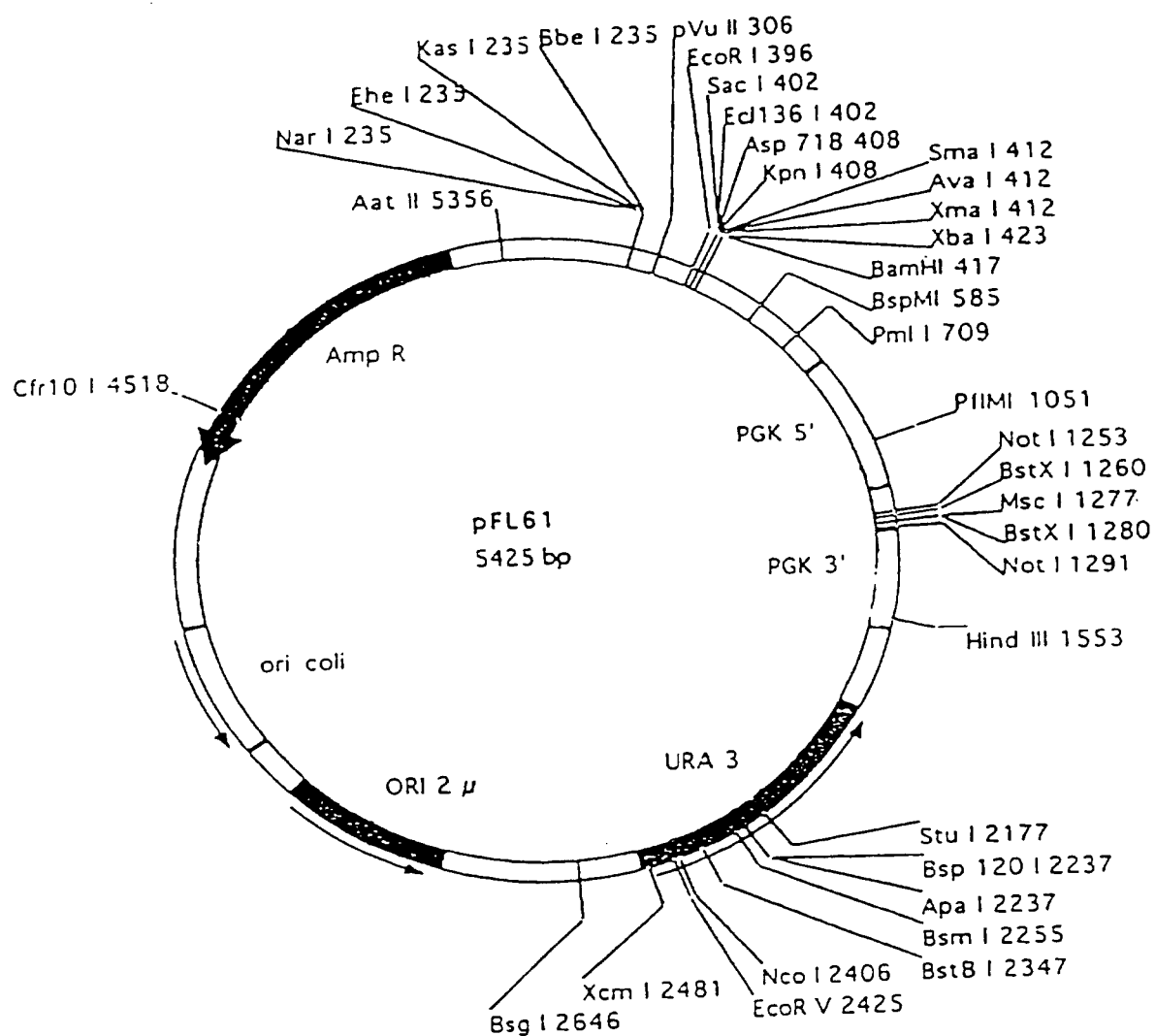


FIG. 5

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

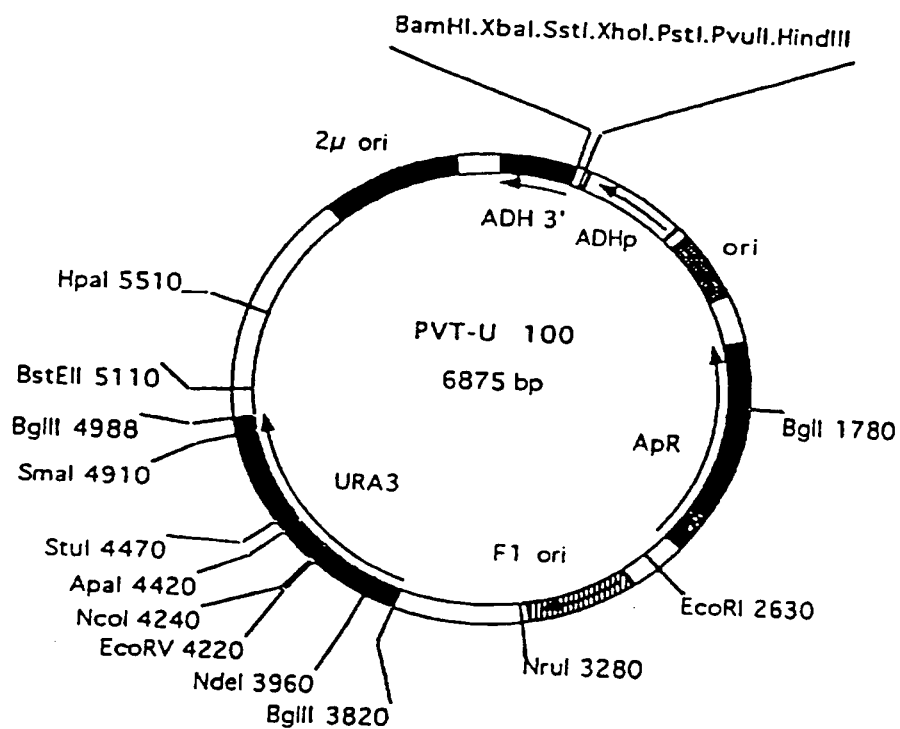


FIG. 6

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter Application No  
PCT 95/01005

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/29 C12N1/21 C12N1/19 C12Q1/68 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C12Q A01H C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PLANT PHYSIOL., vol. 102, pages 327-328, RIVERA-MADRID, R., ET AL. 'Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding an Arabidopsis thaliana thioredoxin h' cited in the application see the whole document ---	1,2,5,6
X	PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 17, pages 143-147, MARTY, I., ET AL. 'Nucleotide sequence of a cDNA encoding a tobacco thioredoxin' cited in the application see the whole document ---	1,2,5,6
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 December 1995

Date of mailing of the international search report

29.12.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 95/01005

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EMBL SEQUENCE DATABASE REL.37. 30-11-93 ACC. NO. D21310. Rice mRNA for thioredoxin (gene name SS396), partial cds see sequence ---	1,2,5,6
X	EMBL SEQUENCE DATABASE REL 40. 23-7-1994. ACC. NO. Z35335. A. thaliana transcribed sequence.Clone TAT6A11 see sequence ---	1,2,5,6
X	EMBL SEQUENCE DATABASE REL.38. 16-2-1994. ACC. NO. D26547. Rice gene for thioredoxin h, complete cds. see sequence ---	5,6
X	EMBL SEQUENCE DATABASE REL.37. 26-11-1993. ACC. NO.D21836. Rice mRNA for thioredoxin h, complete cds. see sequence ---	1,2,5,6
X	J. BIOL. CHEM. (1991), 266(3), 1692-6, GAN, ZHONG RU 'Yeast thioredoxin genes' see figure 1 ---	14,15
X	J. BIOL. CHEM. (1989), 264(7), 4008-14, MULLER, ERIC G. D. ET AL 'Thioredoxin is essential for photosynthetic growth. The thioredoxin m gene of Anacystis nidulans' see page 4010, left column ---	14
A	BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, vol. 873, no. 3, pages 415-418, VOGT, K., ET AL. 'Characterization of three different thioredoxins in wheat' see the whole document ---	1-18
A	PLANT PHYSIOLOGY, vol. 105, 1994 pages 1021-1022, JARAMILLO, J.L., ET AL. 'Cloning and sequencing of a pea cDNA fragment coding for thioredoxin m' see the whole document ---	1-18
A	PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 20, 1992 pages 301-306, AGUILAR, F., ET AL. 'Biosynthesis of active spinach-chloroplast thioredoxin f in transformed E. coli' see the whole document ---	1-18
	---	

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter Application No  
PCT/ 95/01005

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,93 08274 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 29 April 1993 see the whole document ---	1-18
A	PLANT PHYSIOL (BETHESDA) 99 (3). 1992. 919-924., KOBREHEL K ET AL 'SPECIFIC REDUCTION OF WHEAT STORAGE PROTEINS BY THIOREDOXIN H.' cited in the application see the whole document -----	1-18

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCI/FR 95/01005

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9308274	29-04-93	AU-A- 2861792	21-05-93
		CA-A- 2121137	29-04-93
		CZ-A- 9400832	16-08-95
		EP-A- 0672127	20-09-95
		HU-A- 69780	28-09-95
		JP-T- 7502887	30-03-95
		ZA-A- 9207831	27-04-93
<hr/>			

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Dem: internationale No  
 PC1/ 95/01005

 A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
 CIB 6 C12N15/29 C12N1/21

C12N1/19

C12Q1/68

A01H5/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C12Q A01H C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	PLANT PHYSIOL., vol. 102, pages 327-328, RIVERA-MADRID, R., ET AL. 'Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding an Arabidopsis thaliana thioredoxin h' cité dans la demande voir le document en entier ---	1,2,5,6
X	PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 17, pages 143-147, MARTY, I., ET AL. 'Nucleotide sequence of a cDNA encoding a tobacco thioredoxin' cité dans la demande voir le document en entier ---	1,2,5,6
	--- -/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

- 'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- 'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- 'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- 'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- 'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- 'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- 'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- 'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- '&' document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 Décembre 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

2 9. 12. 95

 Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Maddox, A

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EMBL SEQUENCE DATABASE REL.37. 30-11-93 ACC. NO. D21310. Rice mRNA for thioredoxin (gene name SS396), partial cds voir séquence ---	1,2,5,6
X	EMBL SEQUENCE DATABASE REL 40. 23-7-1994. ACC. NO. Z35335. A. thaliana transcribed sequence.Clone TAT6A11 voir séquence ---	1,2,5,6
X	EMBL SEQUENCE DATABASE REL.38. 16-2-1994. ACC. NO. D26547. Rice gene for thioredoxin h, complete cds. voir séquence ---	5,6
X	EMBL SEQUENCE DATABASE REL.37. 26-11-1993. ACC. NO.D21836. Rice mRNA for thioredoxin h, complete cds. voir séquence ---	1,2,5,6
X	J. BIOL. CHEM. (1991), 266(3), 1692-6, GAN, ZHONG RU 'Yeast thioredoxin genes' voir figure 1 ---	14,15
X	J. BIOL. CHEM. (1989), 264(7), 4008-14, MULLER, ERIC G. D. ET AL 'Thioredoxin is essential for photosynthetic growth. The thioredoxin m gene of Anacystis nidulans' voir page 4010, colonne de gauche ---	14
A	BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, vol. 873, no. 3, pages 415-418, VOGT, K., ET AL. 'Characterization of three different thioredoxins in wheat' voir le document en entier ---	1-18
A	PLANT PHYSIOLOGY, vol. 105, 1994 pages 1021-1022, JARAMILLO, J.L., ET AL. 'Cloning and sequencing of a pea cDNA fragment coding for thioredoxin m' voir le document en entier ---	1-18
A	PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 20, 1992 pages 301-306, AGUILAR, F., ET AL. 'Biosynthesis of active spinach-chloroplast thioredoxin f in transformed E. coli' voir le document en entier ---	1-18
	---	

-/--



## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dernière internationale No  
PCT/95/01005

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO,A,93 08274 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 29 Avril 1993 voir le document en entier ---	1-18
A	PLANT PHYSIOL (BETHESDA) 99 (3). 1992. 919-924., KOBREHEL K ET AL 'SPECIFIC REDUCTION OF WHEAT STORAGE PROTEINS BY THIOREDOXIN H.' cité dans la demande voir le document en entier -----	1-18

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Internationale No  
PCT/FR 95/01005

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9308274	29-04-93	AU-A- 2861792	21-05-93
		CA-A- 2121137	29-04-93
		CZ-A- 9400832	16-08-95
		EP-A- 0672127	20-09-95
		HU-A- 69780	28-09-95
		JP-T- 7502887	30-03-95
		ZA-A- 9207831	27-04-93
-----			